

TREC-KREC-SMN1 検出用試薬セット

TKSneoFinder

取扱説明書

特徴および開発の経緯

本試薬は、先天性免疫不全に関わる領域を簡易的に定量測定するための試薬です。先天性免疫不全に関わるT-cell receptor excision circles (TREC) と kappa-deleting recombination excision circles (KREC) の2領域、脊髄性筋萎縮症に関わるSurvival motor neuron 1 (SMN1) 領域、内因性コントロール領域として、Ribonuclease P (RNaseP)、陽性コントロール特異的配列として Internal control (IC) をリアルタイムPCRによって測定可能です。

全般的な注意

- 本取扱説明書をよく読んでから使用してください。取扱説明書に記載された操作方法に従って使用してください。記載した操作方法及び使用目的以外での使用については、信頼性を保証致しかねます。
- すべての検体は感染性のあるものとして扱い、防護具（眼鏡、手袋、マスク等）を着用の上、十分に注意をして操作を行ってください。
- 本試薬は研究用試薬であり、それ以外の目的に使用しないでください。診断目的には使用できません。

形状・構造等（キットの構成）

- | | | |
|-----------------|-------|-----|
| ① 96 ウェルプレート*1 | | 1 枚 |
| ② 反応試薬固相化チューブ*2 | | 1 本 |
| ③ プレートシール | | 1 枚 |

*1:96 ウェルプレートには TREC 領域(FAM)、KREC 領域(Cy5)、SMN1 領域(HEX)、RNaseP(ROX) のプライマー・プローブ、IC (Quasar705) のプローブが固相化されています。また、A1/B1/C1 ウェルには検量線作成用の陽性コントロール (TREC・KREC: 5,000/500/50 コピー、SMN1・RNaseP: 50,000/5,000/500 コピー) が着色剤とともに固相化されています。D1 ウェルは陰性コントロール測定用となります。最大で 92 検体の測定が可能です。

*2: 反応試薬固相化チューブには、プレート 1 枚分の増幅酵素を含む反応試薬が固相化されています。

使用目的

乾燥紙血中の TREC 領域、KREC 領域、SMN1 領域の遺伝子の測定。

操作上の注意

- 反応試薬中のプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入によって分解されると、正確な測定ができません。実験器具・器材以外にも使用者の汗や唾液からヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作には注意してください。
- 検体のコンタミネーションを防ぐため、検体調製・核酸抽出と反応試薬調製は物理的に隔離することを推奨します。困難な場合は、次の作業へ移る前にUV照射や作業スペースの清掃などを行ってください。
- 反応試薬には蛍光試薬が含まれております。2~8°C・除湿環境下で遮光して保存してください。
- 溶解した反応試薬の保存は、2~8°Cで1週間を目安としてください。
- 開封した試薬は使用期限にかかわらずなるべく早くご使用ください。
- 反応試薬固相化チューブの破損の恐れがあるので、高所から落としたり、強い衝撃を加えたりしないよう注意して使用してください。
- 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、検体間のコンタミネーションを防止してください。
- リアルタイムPCR装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。

- 本キットはリアルタイムPCR法を用いており、増幅と測定が同時に行われるため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。コンタミネーションの原因となりますので、増幅産物をPCR用チューブ等から取り出すことはおやめください。

用法・用量（操作方法）

【必要な器具】

必要に応じて以下の器具及び器材を準備してください。

ミキサー、マイクロピペット、フィルターチップ(滅菌済、低吸着、DNase・RNase Free)、プレート用スピンドウン遠心機、リアルタイムPCR装置 (FAM、Cy5、HEX、ROX、Q705が検出可能なリアルタイムPCR装置)

【操作方法】

1. 核酸抽出方法

プレジジョン・システム・サイエンス株式会社のPreLEAD 96GCを用いて検体から核酸抽出を行うことを推奨します。他の市販の核酸抽出キットを用いる事も可能ですが、事前に抽出効率等について評価を行うことを推奨します。

2. 試薬の調製方法

本試薬は20 µL反応系に最適化されています。以下の手順に従い、1反応 (1ウェル) あたり20 µLとなるように調製してください。

- 525 µLの超純水を反応試薬固相化チューブに添加して固相試薬を溶解します。
- 溶解した反応試薬を96ウェルプレートの各ウェルに5 µLずつ分注します。陽性コントロールウェル (A1/B1/C1ウェル) には標準DNAが固相化されているため、交差汚染には十分に注意し、当該ウェルへの試薬の分注は最後に行い、C1、B1、A1の順に分注するようにしてください。
- 各ウェルに検体DNA 15 µLを添加します。陽性コントロールウェル (A1/B1/C1ウェル) および陰性コントロールとするウェルには、超純水を15 µL加えてください。
- 付属のプレートシールで密封し、プレートミキサー等で固相試薬を攪拌溶解し、スピンドウンします。

3. リアルタイムPCRによる測定

BioRad社のCFX Opusのプロトコル例を示します。

- リアルタイムPCR装置の蛍光検出波長をFAM、Cy5、HEX、ROX、Quasar705に設定します。
- 陽性コントロールウェル (A1/B1/C1ウェル) については、固相化されているDNAのコピー数 (TREC・KREC: 5,000/500/50コピー、SMN1・RNaseP: 50,000/5,000/500コピー) を設定します。
- リアルタイムPCRのプログラムの設定は、下記のプロトコルを基準に設定してください。設定方法については、お使いのリアルタイムPCR装置の取扱説明書に従って行ってください。

<PCRプログラム>

ステップ	温度	時間	Cycle数	蛍光検出
初期変性	95°C	10 sec	1 Cycle	なし
PCR	95°C	5 sec	45 Cycles	あり (5色)
	60°C	10 sec		

※Passive Reference設定がある場合は、「None」を選択し、測定を開始してください。

—— 測定結果の判定法 ——

お使いのリアルタイムPCR装置の取扱説明書に従って設定・解析を行ってください。なお、PCRステップのはじめの10サイクルはバックグラウンドシグナル検出の可能性があるため、解析サイクルの対象外とすることを推奨します。また、BioRad社のCFX OpusではRegression法、Baseline Subtracted Curve Fitモードでの解析を推奨します。解析後は、増幅曲線を確認し、Cq値が正しく算出されていることを確認してください。核酸抽出液の精製度、試薬の混和不良、泡立ちなどの原因により、Regression法で正しく解析されない場合には、Single threshold法などで解析してください。解析ソフトの使用方法は、ソフト付属のマニュアルに従ってください。

—— 判定に関わる注意事項 ——

- 1) TRECはFAM、KRECはCy5、SMN1はHEX、RNasePはROXの波長で測定されます。ICプローブ (Quasar705) は、固相化された陽性コントロールウェル (A1/B1/C1ウェル) に人工的に挿入した配列のみを検出するため、通常の検体からは検出されません。検出された場合は、陽性コントロールDNAの反応液への混入が示唆されますので、再検査を実施してください。
- 2) RNasePの増幅が見られない場合は、PCRを実施するために必要な十分量の核酸が存在しない可能性が示唆されますので、再検査を実施してください。
- 3) リアルタイムPCR装置や解析方法によっては、ごく稀にバックノイズシグナルからCq値を算出している場合があります。試験後は必ず増幅曲線を確認し、得られたCq値が核酸増幅の行われた結果に由来していることを確認してください。

—— 性 能 ——

1. 感度・正確性試験

- 1) 陰性コントロール (超純水) を試料として試験するとき、全ての項目で蛍光増幅が検出されません。
- 2) 濃度既知の陽性コントロールを試料として試験するとき、全ての項目で蛍光増幅が検出されます。
- 3) RNaseP/SMN1/TREC/KREC間で交差反応は発生しません。

2. 製品性能データ 等

詳細な性能データにつきましては、製造販売元営業担当又はカスタマーサポート担当にお問い合わせください。

—— 使用上または取扱い上の注意 ——

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- 1) 検体は感染の恐れがあるものとして取扱ってください。
- 2) 試薬が目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師などに相談し、指示を受けてください。

2. 使用上の注意

- 1) 貯蔵方法 (2~8℃) に従い、保存してください。
- 2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 3) 製造番号の異なる試薬を混合して使用しないでください。
- 4) 他の目的に転用しないでください。

3. 廃棄上の注意

- 1) コンタミネーションを避けるため、PCR反応後のチューブやプレートは蓋を開けずに密閉できるビニール袋を2重にし、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物として処理してください。PCR増幅産物は飛散を防止するためオートクレーブ処理を行わないでください。
- 2) 検査に使用した試薬・器具等を廃棄する場合、廃棄物の処理及び清掃に関する法律及び水質汚染防止法等の規定に従って医療廃棄物、産業廃棄物、または感染性廃棄物として処理してください。

—— 貯蔵方法・有効期間 ——

【 貯蔵方法 】

2~8℃で保存してください。

【 有効期間 】

製造日から12ヶ月

※外装のラベルに使用期限を表示してあります。

—— 包装単位 ——

TKSneoFinder (92テスト用) Code 69256

—— 問い合わせ先 ——

〒110-0005 東京都台東区上野 3-24-6

島津ダイアグノスティクス株式会社 カスタマーサポート担当

電話 03(5846)5707

以下の特許は、TKSneoFinderに関するものです。

・特許第6778374号

製造販売元

島津ダイアグノスティクス株式会社

東京都台東区上野 3-24-6 〒110-0005 TEL 03(5846)5611(代)